

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Calonectria* sp. ASSOCIADO AO MURICIZEIRO

Sandra Valéria Dias Cardoso¹; Alessandra Keiko Nakasone Ishida²; Alessandra de Jesus Boari³;
Eduardo Felipe Nunes da Costa⁴

^{1,4}Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), ^{2,3}Embrapa Amazônia Oriental

Resumo: O muricizeiro é uma importante espécie frutífera nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. No entanto, há poucas informações sobre as doenças que ocorrem na cultura e seus devidos danos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar um isolado fúngico associado à queima foliar de plantas de muricizeiro por meio do PCR, seguido do sequenciamento nucleotídico. O isolado fúngico foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias, sendo em seguida realizada a extração de DNA e PCR utilizando-se os primers ITS4/ITS5. Os produtos do PCR foram sequenciados e avaliados via programas Blastn, ClustalW e Mega 5.0, onde se verificou identidade 100% com acessos do gênero *Calonectria*.

Palavras-chave: *Byrsonima crassifolia*, primers ITS

Introdução

Espécies do gênero *Calonectria* e seu anamorfo *Cylindrocladium* têm uma ampla gama de hospedeiros e estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais associadas a sintomas que variam de queimas lesões e manchas foliares, cancrios de caules, tombamento, podridão de raízes e frutos (CROUS et al., 2004; 2006; LOMBARD et al., 2009; 2010). No Estado do Pará, estas espécies foram relatadas em cupuaçu, causando mancha parda (*Calonectria kyotensis*) (BENCHIMOL, 2003), em *Eugenia* spp., *Mammea americana* causando lesões foliares (*Cylindrocladium candelabrum/Calonectria scoparia*, *C. spathiphylli/Calonectria spathiphylli*, *Cylindrocladium pteridis*) (POLTRONIERI et al., 2004a; 2004b; 2011a), em mogno africano, teca e coqueiro causando manchas foliares (*Cylindrocladium parasiticum*, *Cylindrocladium pteridis*) (TRINDADE et al., 1998; POLTRONIERI et al., 2000; 2011b) e coqueiro causando podridão peduncular em frutos (*Cylindrocladium floridanum*) (POLTRONIERI et al., 2003).

O murucizeiro (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.) é uma espécie frutífera da família Malpighiaceae, e apresenta ampla distribuição geográfica no território brasileiro, ocorrendo espontaneamente, com maior frequência e abundância, nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste

(CARVALHO & NASCIMENTO, 2008). No entanto, existem poucas informações sobre as doenças que ocorrem na cultura e seus danos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo identificar um isolado fúngico associado à queima foliar de plantas de muricizeiro por meio do PCR, seguido do sequenciamento nucleotídico.

Material e Métodos

Utilizou-se neste trabalho um isolado fúngico obtido de plantas de muricizeiro apresentando sintomas de queima foliar, provenientes do Campo Experimental de Tomé-Açu (CETA), o qual se encontra preservado em óleo mineral no Laboratório de Fitopatologia.

Para a extração do DNA, utilizou-se uma colônia do isolado fúngico cultivada em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997). As reações de PCR foram elaboradas em um volume total de 50 µL contendo 1µL do DNA fúngico, 5µL de tampão 5X, 3µL de MgCl₂, 0,5µL dos primers ITS4 e ITS5, 1µL de dNTP, 0,6µL de Taq polimerase e 33 µL de água ultra pura. As condições de amplificação foram: 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 50°C e 30 seg. a 72°C, seguido de 5 min. a 72°C. O produto do PCR foi avaliado em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium) e fotodocumentado. Posteriormente, fez-se a limpeza do produto do PCR utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), seguido da quantificação de DNA. Os produtos de PCR da região ITS foram sequenciados pela empresa HelixxaBase for Life. As sequências foram avaliadas utilizando os programas Blastn, ClustalW e Mega 5.0.

Resultados e Discussão

Foram amplificados fragmentos de DNA de cerca de 450 pb na região ITS, a partir do isolado fúngico obtido do muricizeiro. O isolado associado à queima foliar, apresentou identidade 100% com acessos do gênero *Calonectria* disponíveis no GenBank. No Estado do Pará, este gênero foi relatado causando lesões e manchas foliares em *Eugenia stipitata*, *Eugenia patrisii*, *Eugenia brachypoda*, *Mammea americana*, *Tectona grandis*, *Cocos nucifera* e *Khayai vorensis* (TRINDADE et al., 1998; POLTRONIERI et al., 2000; 2004a; 2004b; 2011a; 2011 b).

Apesar da região ITS ser amplamente empregada para identificação molecular de fungos, sugere-se o sequenciamento de outros genes para a identificação da espécie. O isolado de *Calonectria* sp. se encontra preservado em óleo mineral no Laboratório de Fitopatologia de Embrapa Amazônia Oriental para posterior caracterização morfológica e sequenciamento de outros genes indicados para o

gênero *Calonectria*. A etiologia da doença é um passo essencial para estudos epidemiológicos, bem como para o estudo de estratégias de manejo efetivas para cada patógeno (MARQUES et al., 2013).

Conclusão

O sequenciamento da região ITS permitiu a identificação do gênero *Calonectria* associado à queima foliar do muricizeiro. Para a identificação da espécie, será realizado o sequenciamento de outros genes indicados para o gênero *Calonectria*.

Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto de pesquisa “Melhoramento genético do bacurizeiro, camucamuzeiro, muricizeiro e cajazeira do Norte” (02.11.02.001.00.00).

Referências Bibliográficas

- BENCHIMOL, R. L. Principais doenças do cupuaçuzeiro e recomendações de controle. 2003.
- CARVALHO, J.E.U.; NASCIMENTO, W.M.O. Caracterização dos pirênios e métodos para acelerar a germinação de sementes de muruci do clone Açú. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, 2008.
- CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISÈDE, J.M.; SIMONEAU, P.; HYWEL-JONES, N.L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaero pedunculate vesicles. **Studies in Mycology**, v.50, p.415–430, 2004.
- CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISÈDE, J.M.; SIMONEAU, P.; D. HYDE, K.D. *Calonectria* *Cylindrocladium* species associated with dying Pinus cuttings. **Persoonia**, v.23, p.41–47. 2009.
- GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of virology methods**, v.63, p.9-16, 1997.
- LOMBARD, L.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Species concepts in *Calonectria* (*Cylindrocladium*). **Studies in Mycology**, v.66, p.15-30, 2010.
- LOMBARD, L.; RODAS, C.A.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. **Studies in Mycology**, v.55, p.213-226, 2006.

MARQUES, M.W.; LIMA, N.B.; MORAIS JUNIOR, M.A.; BARBOSA, M.A.G.; SOUZA, B.O.; MICHEREFF, S.J.; PHILLIPS, A.J.L.; CÂMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181–193, 2013.

POLTRONIERI, L.S.; ALFENAS, A.C.; TRINDADE, D.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; BENCHIMOL, R.L. A new disease of the african mahogany caused by *Cylindrocladium parasiticum* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n.2, p. 204, 2000.

POLTRONIERI, L.S.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, M.C. *Cylindrocladium pteridis* leaf spot of apricot tree in the state of Para, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.104-104, 2004a.

POLTRONIERI, L.S.; ALFENAS, R.F.; ALFENAS, A.C.; VERZIGNASSI, J.R.; BENCHIMOL, R.L.; POLTRONIERI, T.P.S. Primeiro registro de *Cylindrocladium parasiticum* em plantas de teca no Pará. **SummaPhytopathologica**, v.37, p.152-152, 2011b.

POLTRONIERI, L.S.; ALFENAS, R.F.; VERZIGNASSI, J.R.; ALFENAS, A.C.; BENCHIMOL, R.L.; POLTRONIERI, T.P.S. Leaf blight and defoliation of *Eugenia* spp. caused by *Cylindrocladium candelabrum* and *C. spathiphylli* in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.37, p.147-149, 2011a.

POLTRONIERI, L.S.; SILVA, J.F.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; TRINDADE, D.R. *Eugenia brachypoda*, new host of *Cylindrocladium pteridis* in the State of Para, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.459-459, 2004b.

POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; ALFENAS, A.C.; ALBUQUERQUE, F.C.; CARVALHO, J.E.U. Podridão peduncular de coco causada por *Cylindrocladium floridanum* no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.106-106, 2003.

TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; ALBUQUERQUE, F.C. Ocorrência de mancha foliar em coqueiro causada por *Cylindrocladium pteridis* no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.3, p.412, 1998.